

CURSO ACADÉMICO 2017-2018

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PROTEÓMICA DEL  
SECRETOMA CUTÁNEO EN FUNCIÓN DE LA  
METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN, LA  
TRANSFORMACIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS**

**MARÍA IRANZO MARTÍNEZ**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Tutor: Dr. Eloi Garí**

17 de enero de 2018



# ÍNDICE

RESUMEN.....	II
RESUM .....	II
ABSTRACT .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	III
LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS .....	IV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA REVISIÓN .....	2
4. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA .....	4
5. CONTENIDO DE LA REVISIÓN .....	6
5.1. ESTRUCTURA DE LA PIEL .....	6
5.2. CÁNCERES CUTÁNEOS NO MELANÓMICOS.....	8
5.2.1. Carcinoma basocelular .....	8
5.2.2. Carcinoma escamoso .....	9
5.3. SECRETOMA .....	9
5.3.1. Composición .....	10
5.3.2. Técnicas de obtención del secretoma.....	11
5.4. COMPARACIÓN PROTEICA.....	13
5.4.1. Metodología de obtención .....	13
5.4.2. Queratinocitos sanos y carcinoma escamoso .....	15
5.4.3. Otras comparaciones .....	19
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	23
6.1. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN .....	23
6.2. QUERATINOCITOS SANOS Y CARCINOMA ESCAMOSO.....	24
6.3. OTRAS COMPARACIONES .....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	28

## RESUMEN

El secretoma es el conjunto de moléculas que secreta una célula, incluyendo metabolitos, microRNAs y proteínas. La composición proteica del secretoma ya ha sido caracterizada en diversos tejidos normales, como la epidermis, utilizando diferentes aproximaciones experimentales y técnicas. Sin embargo, se ha comprobado que las células tumorales presentan cambios en la composición del secretoma respecto a los tejidos sanos, y que estas variaciones son importantes en el desarrollo tumoral y en la metástasis. El carcinoma escamoso cutáneo, la segunda forma más común de cáncer de piel, posee un elevado poder invasivo y deriva en metástasis cuando no es tratado y extirpado tempranamente. En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión y un análisis comparativo de la composición proteica del secretoma de la epidermis proporcionada por distintos trabajos. Además, se han analizado las variaciones entre el secretoma propuesto para el carcinoma escamoso de piel y el tejido cutáneo normal. Tal y como muestran los resultados, la diversidad en la composición del secretoma, en función de las aproximaciones de obtención, concluye la gran influencia que supone la metodología. Además, los análisis realizados han permitido encontrar proteínas del secretoma exclusivas del carcinoma escamoso de piel, siendo posible su utilización como biomarcadores.

## RESUM

El secretoma és el conjunt de molècules que secreta una cèl·lula, incloent metabòlits, microRNAs i proteïnes. La composició proteica del secretoma ja ha estat caracteritzada en diversos teixits normals, com l'epidermis, utilitzant diferents aproximacions experimentals i tècniques. No obstant això, s'ha comprovat que les cèl·lules tumorals presenten canvis en la composició del secretoma respecte als teixits sans, i que aquestes variacions són importants en el desenvolupament tumoral i en la metàstasi. El carcinoma escamós cutani, la segona forma més comuna de càncer de pell, té un elevat poder invasiu i deriva en metàstasi quan no es tractat i extirpat aviat. En aquest treball s'ha dut a terme una revisió i una anàlisi comparativa de la composició proteica del secretoma de l'epidermis proporcionada per diferents treballs. A més, s'han analitzat les variacions entre el secretoma proposat per al carcinoma escamós de pell i el teixit cutani normal. Tal com mostren els resultats, la diversitat en la composició del secretoma, en funció de les aproximacions d'obtenció, conclou la gran influència que suposa la metodologia. A més, les anàlisis realitzades han permès trobar proteïnes del secretoma exclusives del carcinoma escamós de pell, sent possible la seva utilització com a biomarcadors.

## **ABSTRACT**

The secretome is the set of molecules that a cell secretes, including metabolites, microRNAs and proteins. Protein composition of the secretome has already been characterized in several normal tissues, such as the epidermis, using different experimental and technical approaches. However, it has been demonstrated that tumor cells present changes in the composition of the secretome in regards to normal tissues, and that these variations are important in the tumor development and metastasis. Cutaneous squamous cell carcinoma, the second most common form of skin cancer, has a high invasive power and metastasizes when it is not treated and removed early. In this paper a review and a comparative analysis of the protein composition of the epidermal secretome provided by different studies has been carried out. In addition, variations between the proposed secretome for skin squamous cell carcinoma and normal cutaneous tissue have been analyzed. As the results show, the diversity in the composition of the secretome, depending on the approximations of obtention, concludes the great influence that the methodology supposes. In addition, in the comparative analysis we have described secretome proteins that are only present in squamous cell carcinoma of the skin, being possible their use as biomarkers.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer al Dr. Eloi Garí, su gran implicación como tutor en esta revisión bibliográfica. Desde que aceptó mi petición de tutorarme en el desarrollo de este trabajo, su ayuda, colaboración y sobretodo, paciencia, han sido imprescindibles para la realización del mismo. Las propuestas y sugerencias proporcionadas desde el principio han hecho de esta revisión, un trabajo apasionante.

Dar las gracias, también, a mi familia, que pese a no poder contar con su presencia en el día a día, ha hecho posible que hoy este realizando este trabajo para poner punto y final al grado de Biotecnología.

Y por último, a la persona que me ha soportado día tras día, que ha puesto su granito de arena en el trabajo y que ha sido un pilar fundamental a lo largo de todo este proceso.

## **LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS**

**BCC:** Basal cell carcinoma, carcinoma de células basales.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

**ECM:** Matriz extracelular.

**EVs:** Vesículas extracelulares.

**FBS:** Suero fetal bovino.

**GO:** Gene Ontology.

**IF:** Interstitial fluid, fluido intersticial.

**KCM:** Medio condicionado de queratinocitos.

**KSFM:** Medio condicionado de queratinocitos libre de suero.

**LC-MS/MS:** Cromatografía líquida acoplada a una espectrofotometría de masas doble.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute.

**SCC:** Squamos cell carcinoma, carcinoma de células escamosas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, término que engloba más de 200 enfermedades, caracterizadas todas, por la multiplicación y expansión descontrolada de una célula, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En el año 2012 se registraron más de 14 millones de nuevos casos y en el 2015 la enfermedad causó 8,8 millones de defunciones.

Pese a conocerse los principales factores de riesgo de esta enfermedad: elevado índice de masa corporal, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, tabaquismo y alcoholismo, se estima que el número de casos aumentará hasta en un 70% en los próximos 20 años ("OMS | Cáncer," 2017).

Aunque las neoplasias malignas más mortales son el cáncer pulmonar, el hepático, el colorrectal, el gástrico y el mamario, esta revisión bibliográfica se ha centrado en analizar otro tipo en concreto: los cánceres cutáneos no melanómicos. Esta denominación abarca algunos carcinomas de piel como el basocelular (BCC) y el escamoso o espinocelular (SCC), que pese a no poseer una gran mortalidad asociada, representan una de las formas más frecuentes de cáncer en la sociedad actual.

Como ya se ha determinado con exactitud, el cáncer no solo depende de una serie de factores externos denominados carcinógenos, sino que es resultado de la combinación de estos últimos, con los propios factores genéticos del paciente. Pese a la dificultad añadida que supone la intervención de componentes genéticos en la enfermedad, la prevención, la detección precoz y el tratamiento adecuado y específico, pueden ser la clave para reducir la mortalidad que lleva asociada esta patología.

El principal problema es, que a pesar del gran abanico de tratamientos de los que hoy en día se dispone para luchar contra esta enfermedad, todavía no se ha hallado la solución definitiva. Por este motivo, la necesidad de ampliar al máximo el conocimiento sobre esta patología, y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, no ha cesado.

Una de las aproximaciones en las que más se ha trabajado en los últimos años es la secretómica o estudio del secretoma. El secretoma, el conjunto de vesículas y moléculas que secretan las células, puede ser de gran utilidad a la hora de entender el comportamiento celular.

El secretoma puede reflejar una amplia variedad de condiciones patológicas y representar una fuente muy rica de nuevos biomarcadores. Debido a ello puede ser la diana perfecta para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas en el caso de cualquier tipo de cáncer.

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos principales de esta revisión bibliográfica podrían ser definidos en varios puntos. En primer lugar, llevar a cabo un análisis para estudiar la composición proteica del secretoma de la piel. Además, se tratará de comprobar, si en función de la técnica utilizada, obtención del líquido intersticial o cultivo en medio condicionado, la composición del mismo varía.

En segundo lugar, analizar si existen variaciones entre el secretoma de células cutáneas sanas y el segundo carcinoma no melanómico más frecuente, el carcinoma escamoso de piel. Se tratará de identificar a qué puede ser debida esta variación y cuál es su función putativa en las células del tumor.

Y para finalizar, si en algún caso la variación proteica del secretoma, entre células sanas y tumorales es indicadora de transformación tumoral o metástasis. De esta manera se podrían localizar marcadores oncogénicos aplicables al diagnóstico de este tipo de neoplasia cutánea, pero también, al diseño de terapias dirigidas contra esta clase concreta de tumor.

## **3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA REVISIÓN**

La revisión bibliográfica se ha fundamentado, principalmente, en la búsqueda de información sobre las proteínas que forman parte del secretoma de la epidermis, de queratinocitos sanos y de queratinocitos procedentes de carcinoma escamoso, para su posterior estudio mediante diferentes análisis comparativos.

Es importante destacar, que este trabajo estaba orientado, en un principio, a analizar no solo el carcinoma escamoso (SCC) si no también el basocelular (BCC). Sin embargo, sobre este último no se localizaron estudios en los que se caracterizara el secretoma, y por tanto, el trabajo pasó a focalizarse, única y exclusivamente en el SCC.

Además, se trató de localizar diferentes artículos sobre las diversas técnicas para la obtención de dicho secretoma, y su posterior análisis, para determinar el contenido proteico. De este modo, se puede llevar a cabo un análisis crítico sobre la influencia de la metodología empleada en el resultado obtenido.

Para localizar estudios en los que se obtuviera la información requerida se utilizaron, básicamente, 3 bases de datos: *Web of science*, *Google académico* y *Pubmed*. En todas ellas, aunque principalmente en *Web of science*, se hizo de uso de palabras clave, presentes en el título o relacionadas con el tema, para afinar al máximo la búsqueda.

En primer lugar, se buscaron estudios en los que se caracterizaran las proteínas del secretoma de la piel sana a través de un método concreto de obtención: el análisis del líquido intersticial. Para dicha finalidad se utilizaron las palabras clave: quantitative proteomics y human skin.

A continuación, se trató de encontrar un trabajo en el que se analizaran, del mismo modo, las proteínas secretadas por las células cutáneas sanas, pero obtenidas a través de una técnica diferente. El caso que cumplía ambos requisitos resultó ser un cultivo en medio condicionado de queratinocitos obtenidos a partir de una biopsia de piel sana. Estos queratinocitos son el tipo celular más abundante de la capa de la piel en la que se centra la revisión, la epidermis. Por este motivo, el estudio de este tipo celular en concreto se podría asemejar a los queratinocitos integrantes de una epidermis completa y sana. Para localizar artículos que trataran este tema se utilizaron las palabras clave human keratinocytes y proteins released.

Tras ello, se realizó una tercera búsqueda sobre el contenido proteico del secretoma de células de carcinoma escamoso o espinocelular. En este caso, las palabras utilizadas para la búsqueda bibliográfica, también en *Web of science*, fueron squamos cell carcinoma y secretion of proteins.

Además, se quiso localizar un estudio en el que se caracterizara todo el proteoma humano, pero en el que se diferenciara el tejido u órgano de obtención, y el lugar concreto de procedencia. De esta forma se contaría con toda la lista de proteínas secretadas por la piel para localizar posibles fallos u errores en los conjuntos proteicos estudiados en los casos previos. En este caso las palabras clave que se utilizaron fueron tissue map y human proteome.

Una vez recogidos todos los listados proteicos, y para llevar a cabo una comparación entre ellos, se asoció cada una de las proteínas con el código de entrada de la base de datos *UniProt*. Este proceso fue necesario debido a la disparidad de las denominaciones dadas a las proteínas en cada uno de los estudios utilizados. Fue este dígito alfanumérico, propio de cada proteína, el que se utilizó para realizar las múltiples comparaciones llevadas a cabo a través de una función específica del programa *Microsoft excell*.

Tras obtener los resultados, y para que estos fueran más visuales, se generaron diagramas de Venn, un tipo de gráfico comparativo circular que muestra la relación entre varios conjuntos de datos y que es útil para representar gráficamente la agrupación de diversos elementos.



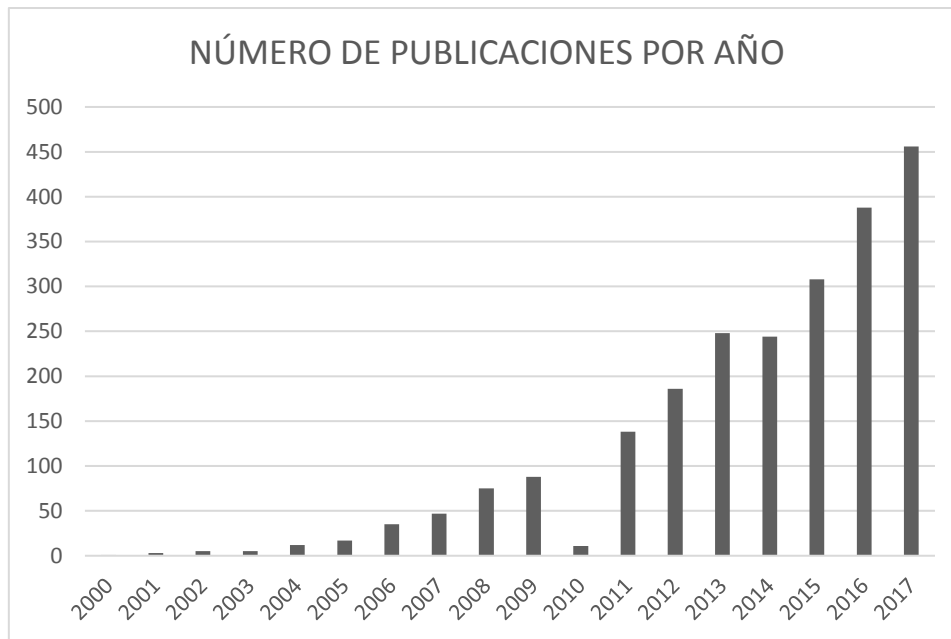
Resaltar, también, la utilización de *Gene Ontology Consortium (GO)* para caracterizar las proteínas que, exclusivamente, eran secretadas por los queratinocitos de la línea tumoral de SCC. Dentro de esta aplicación se utilizó la herramienta *PANTHER Pathways*, para determinar en qué vías de señalización estaba implicado este conjunto proteico y si de este modo, se podía concluir su implicación en la transformación tumoral o en la metástasis. *PANTHER Pathways* analiza, en primer lugar, la base proteica humana determinando qué porcentaje está implicado en cada vía de señalización. En relación a este dato calcula qué tanto por ciento del listado proteico proporcionado cabría esperar que estuviera relacionado con cada una de dichas rutas por azar. Tras ello, comprueba qué número de proteínas está verdaderamente relacionado con las vías de señalización y proporciona el porcentaje de enriquecimiento, en función de si el resultado es superior o inferior al esperado. De esta forma es posible comprobar si el secretoma proteico analizado está enriquecido con proteínas con un determinado papel en la célula.

Tampoco conviene olvidar, la búsqueda de toda la bibliografía requerida para la caracterización de los temas analizados en la revisión bibliográfica llevada a cabo. Desde la composición del secretoma de las células vivas, hasta la composición de la piel, pasando por la caracterización de los diferentes tipos de cánceres cutáneos no melanómicos. Para dicha finalidad, se utilizó, básicamente, la base de datos *Google académico* y palabras clave del tipo extracellular vesicles, secretome, cutaneous squamous cell carcinoma... encontrando toda la información necesaria. Destacar, además, que algunos de los trabajos utilizados fueron obtenidos a través de la bibliografía de otros artículos ya seleccionados.

Se hizo uso también de páginas web de organizaciones y asociaciones tales como la *Organización mundial de salud*, la *Sociedad americana del cáncer* o la *Asociación española contra el cáncer* para caracterizar la incidencia de los tipos de neoplasias malignas analizadas en la revisión bibliográfica, así como las previsiones futuras de las mismas.

#### **4. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

La búsqueda bibliográfica llevada a cabo permitió constatar la relevancia que ha adquirido el estudio del secretoma en los últimos años. Tal y como muestra la *figura 1*, el número de artículos publicados relacionados con este asunto ha crecido exponencialmente en la última década.



*Figura 1: Número de publicaciones por año relacionadas con el estudio del secretoma.*

En la búsqueda de información sobre el secretoma de piel sana se localizó un estudio en el que se analizaba otra enfermedad, la displasia ectodérmica, y se comparaba con la piel sana. Pese a la caracterización de otra patología, al analizarse también el secretoma de la piel normal se obtuvo la información necesaria de ese artículo. Además, se trataba de un trabajo relativamente nuevo, publicado en 2015, por lo que las proteínas caracterizadas entonces no habrían sufrido una variación demasiado importante a día de hoy. Las palabras utilizadas en *Web of science*, como ya se ha mencionado con anterioridad, fueron human skin secretome y proteomics, y el único resultado fue dicho estudio.

A continuación, para buscar un análisis proteico del secretoma de queratinocitos se utilizaron, en un primer momento, las palabras clave human keratinocytes y secretome proteins en *Web of science*. Sin embargo, no encontrarse resultados, se sustituyó la búsqueda por human keratinocytes y proteins released. En este caso se localizaron 11 trabajos, aunque solo uno de ellos caracterizaba cuáles eran las proteínas secretadas por este tipo celular. Cabe destacar que los resultados obtenidos en esta búsqueda correspondían a artículos relativamente antiguos, pero que, sin embargo, se utilizó uno de los más recientes, del año 2009.

Tras ello, se necesitaba localizar la información relativa al proteoma del carcinoma escamoso, en este caso ni secretome ni released proteins fueron útiles para encontrar los artículos necesarios. Se usaron, finalmente, también en *Web of science*, las palabras secretion of proteins como título del trabajo y squamous cells carcinoma como tema.

Con estos caracteres de búsqueda se localizaron 8 artículos y de nuevo, solo en uno se trataba todo el secretoma de este tipo de neoplasia. Destacar que los trabajos relacionados encontrados fueron publicados hacía varias décadas, y que el utilizado y que cumplía los requisitos era bastante reciente, del 2010.

En la búsqueda de un trabajo que caracterizara todo el proteoma del organismo y lo clasificara en función de si era secretado y del tipo tisular al que pertenecía se localizaron 5 artículos, utilizando como palabras clave tissue map y human proteome. Todos, excepto uno, habían sido publicados en los últimos 4 años. El seleccionado, ya que contenía toda la información requerida, era del año 2015.

## **5. CONTENIDO DE LA REVISIÓN**

El cáncer de piel o cáncer cutáneo es uno de los tumores más comunes en la sociedad actual. Estudios recientes han demostrado que más del 20% de la población mundial desarrollará este tipo de cáncer a lo largo de toda su vida (Xiang et al., 2017).

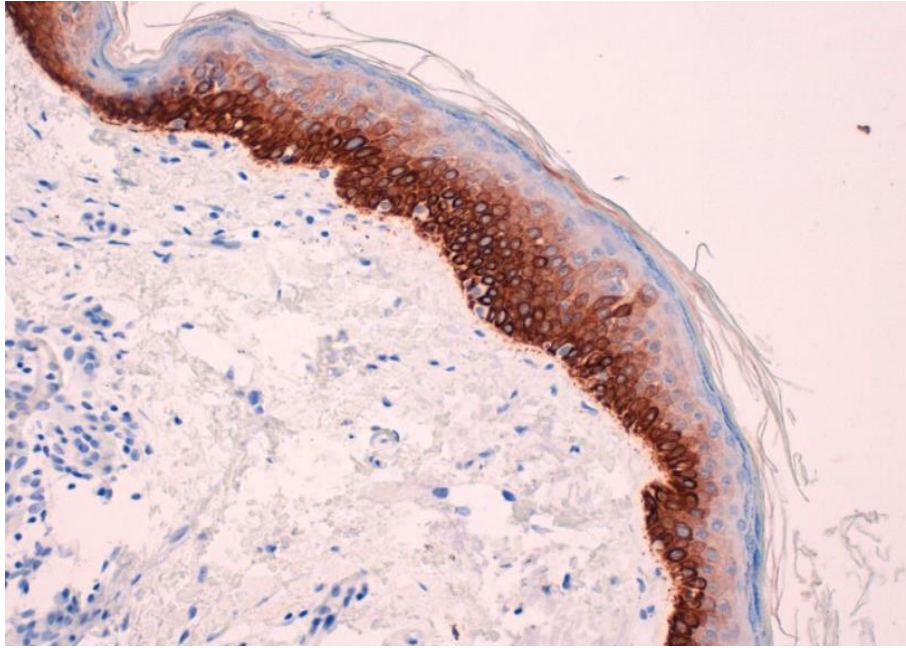
Aunque el melanoma, originado en los melanocitos, es el responsable principal de la mortalidad asociada a esta clase de neoplasia maligna, solo representa el 1% de todos los casos (Cancer, 2017). Esta mortalidad se ha visto incrementada en los últimos años debido a factores como la contaminación medioambiental y el aumento de la intensidad de la radiación ultravioleta (Kang et al., 2017).

Existen, además, otros tumores cutáneos malignos clasificados como no melanómicos con una mortalidad asociada mucho menor, siendo los principales, el carcinoma basocelular y el carcinoma escamoso, epidermoide o espinocelular. La principal diferencia entre ambos tipos es el origen celular del que parten, tal y como su nombre indica: células basales o células escamosas de la piel, respectivamente.

Otros tumores cutáneos, mucho más atípicos e infrecuentes son el sarcoma de Kaposi, el carcinoma de células de Merkel, el linfoma cutáneo, otros tipos de sarcoma y los tumores de los anexos de la piel, que se originan en los folículos pilosos o en las glándulas cutáneas (American Cancer Society, 2017).

### **5.1. ESTRUCTURA DE LA PIEL**

La piel es el órgano de mayor tamaño del organismo humano, representa una gran barrera de protección frente a sustancias y patógenos externos, y está involucrada en funciones tales como la absorción, la secreción, la regulación térmica y la actuación del sistema inmune (Burian et al., 2014).



*Figura 2: Imagen de un corte histológico de piel humana teñida con citoqueratina 5, un marcador de capa basal de la epidermis.*

El órgano cutáneo es un epitelio estratificado, representado en la *figura 2*, en el que se pueden diferenciar tres capas: la epidermis, rica en queratinocitos y melanocitos, la dermis, rica en fibroblastos y la hipodermis, rica en adipocitos. A su vez, cada una de ellas consta de diferentes estratos o regiones que se caracterizan por su composición, o por desarrollar funciones características.

La epidermis, tiene un papel clave en los carcinomas cutáneos, ya que, el origen de muchos de ellos (melanoma, carcinomas cutáneos no melanómicos...) son componentes celulares presentes en esta capa de la piel. Además, al tratarse de la zona más externa debe hacer frente a todos los factores exógenos que puedan dañarla o lesionarla.

Con el fin de desarrollar todas las tareas que recaen sobre ella, la epidermis debe renovarse de forma continua para tratar de mantener al máximo su funcionalidad. La herramienta clave con la que cuenta esta parte de la piel son las células madre que se acumulan en la capa basal, la zona más interna de la epidermis. Esta capa descansa sobre una fina membrana rica en matriz extracelular (ECM) y factores de crecimiento, la membrana basal.

Las células madre que allí se generan sufren un proceso de diferenciación progresivo hasta queratinocitos maduros, al mismo tiempo que se desplazan hacia las capas superiores de la epidermis. Los estratos que conforman la epidermis vienen por tanto, definidos, por el estado de diferenciación de los queratinocitos.

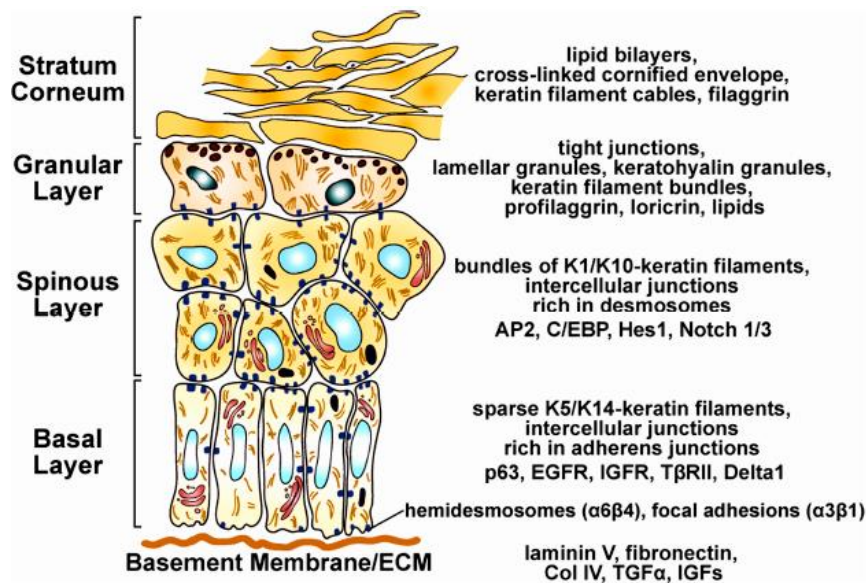


Figura 3: Representación esquemática de los diferentes estratos de la epidermis.

Tal y como se representan en la *figura 3*, las capas en las que puede ser dividida la epidermis, además de la basal, son la espinosa, la granular y el estrato corneo. En la imagen también se muestran otros componentes característicos de cada uno de los estratos tales como factores de crecimiento, proteínas, lípidos, o diferentes tipos de uniones.

Con este proceso de renovación continua de la epidermis, las capas más externas de la piel se van desprendiendo a la vez que son remplazadas por nuevos queratinocitos, manteniendo así la homeostasis y la capacidad propia de la epidermis para defenderse de los microbios, la deshidratación y para hacer frente a posibles lesiones causadas por múltiples agentes externos (Fuchs, 2008).

## 5.2. CÁNCERES CUTÁNEOS NO MELANÓMICOS

Los principales tipos de neoplasias cutáneas no melanómicas, el carcinoma basocelular y el carcinoma escamoso o espinocelular, representan uno de los tipos más frecuentes de cáncer en la sociedad actual (Wu et al., 2015). Aunque ambos tipos de carcinoma tienen su origen en la epidermis, no solo difieren en el tipo celular concreto a partir del que se originan, sino también en su capacidad de desarrollar metástasis.

### 5.2.1. Carcinoma basocelular

El carcinoma basocelular (BCC), neoplasia que se origina en las células de la capa basal, corresponde aproximadamente al 70% de todos los casos de tumores cutáneos (Carvalho, Miot, Esther, & Marques, 2017). Este tipo de cáncer no melanómico raramente produce metástasis, y aunque su tratamiento puede presentar bastantes retos, es generalmente curable con las terapias clásicas (Rees et al., 2015).

### **5.2.2. Carcinoma escamoso**

El carcinoma escamoso, epidermoide o espinocelular (SCC), es la segunda forma más común de cáncer de piel, representando entre el 20 y 25% de los casos (Martorell-Calatayud et al., 2013). Este tipo de neoplasia proviene de la transformación tumoral de las células de la capa espinosa de la epidermis.

Aunque en muchos casos se encuentran localizados a nivel cutáneo y pueden ser tratados con escisión quirúrgica u otros procedimientos locales, existen otros más agresivos con tendencia a la recurrencia, la expansión linfática o la invasión de distintos órganos. El porcentaje de tumores de este tipo que desarrollan metástasis, es decir, con capacidad para generar depósitos tumorales a distancia, suele estar en torno al 5% (Nu et al., 2012).

La aparición de estos tipos de SCC, denominados como de alto riesgo, puede ser incrementada por desórdenes genéticos tales como el xeroderma pigmentosum, el albinismo oculocutáneo o la disqueratosis congénita entre otros; lesiones cutáneas de tipo quemaduras, úlceras, dermatitis; o por situaciones de inmunosupresión (Martorell-Calatayud et al., 2013).

El tratamiento actual para este tipo de neoplasia incluye una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia, sin embargo, el diagnóstico para SCC de alto riesgo, avanzado o metastásico es todavía poco satisfactorio (Xiang et al., 2017).

### **5.3. SECRETOMA**

En los últimos años, el análisis del plasma o el suero sanguíneo a través de espectrometría de masas ha sido una de las principales herramientas utilizadas en investigación para tratar de descubrir nuevos biomarcadores oncogénicos. Sin embargo, en la última década, el secretoma se ha propuesto como una alternativa a este método tradicional debido a las dificultades, planteadas por el plasma, en términos de complejidad y baja abundancia de biomarcadores específicos (Méndez & Villanueva, 2015).

Una valiosa fuente de información, por tanto, sobre una neoplasia cutánea no melanómica, y en general de cualquier tipo de cáncer, es todo el conjunto de sustancias que las células tumorales secretan al exterior. Identificar las moléculas secretadas no solo puede permitir aumentar el grado de conocimiento sobre esta patología, sino también localizar posibles dianas moleculares para nuevos tratamientos antitumorales.

Además, comprender y analizar el funcionamiento de todo este conjunto de sustancias liberadas por el tumor, y a su vez, la comparación con el secretoma de una célula sana, puede permitir identificar marcadores de desarrollo tumoral o metástasis, sirviendo a la vez como herramientas de diagnóstico.

### **5.3.1. Composición**

El término secretoma hace referencia a todo aquello que es secretado al exterior por una célula viva. Es decir, el concepto, no solo incluye todo el conjunto de moléculas como tal (proteínas, péptidos, hormonas...) (Makridakis & Vlahou, 2010), sino también todas las vesículas que son excretadas al exterior y que a su vez son, también una fuente de proteínas y de otros tipos moleculares.

Estas vesículas extracelulares (EVs), que recientemente han sido caracterizadas como una nueva forma de comunicación intracelular, median el intercambio de factores de señalización solubles o insolubles, así como de moléculas de diferente naturaleza incluidas proteínas, ácidos nucleicos, y lípidos. Además, las EVs pueden viajar a través de los fluidos del cuerpo trasladando o transportando la información a emplazamientos distantes in vivo (Méndez & Villanueva, 2015).

Se ha comprobado que estas vesículas, que pueden ser clasificadas según su tamaño en exosomas, microvesículas y grandes oncosomas extracelulares (Minciacchi, Freeman, & Di, 2015) están involucradas en el desarrollo del cáncer. Las células tumorales liberan estas vesículas para invadir los tejidos o propagar las señales oncogénicas a distancia (Minciacchi et al., 2015).

Estos fluidos biológicos han llegado a estar en estrecho contacto con las células tumorales por lo que pueden estar enriquecidos con proteínas secretadas o liberadas que sean relevantes para la enfermedad. La presencia de factores de crecimiento y proteasas indica que el secretoma puede ayudar en la monitorización de diferentes aspectos clave en la progresión del cáncer como la invasión o la metástasis (Lawlor, Nazarian, Lacomis, Tempst, & Villanueva, 2009).

Además, el secretoma de una célula está poblado por citoquinas inmunomoduladoras, quimiosinas, proteínas de la matriz extracelular y ectodominios de los receptores de la membrana plasmática. El enriquecimiento de estos fluidos con proteínas extracelulares y de membrana involucradas en procesos biológicos como la adherencia, la respuesta a los estímulos y la locomoción, e incluso en la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis, sugiere que el secretoma puede representar una fuente de biomarcadores tumorales efectivos y novedosos (Méndez y Villanueva, 2015).

### **5.3.2. Técnicas de obtención del secretoma**

Las técnicas de obtención del secretoma analizadas y comparadas en esta revisión bibliográfica son tres. En primer lugar, se lleva a cabo un análisis del líquido intersticial (IF) de células normales cutáneas a partir de una biopsia de piel sana. Este fluido al encontrarse localizado entre las células del epitelio cutáneo, proporcionará información no solo, sobre las proteínas, libres o contenidas en los diferentes tipos vesiculares, que secretan las células, sino que también incluirá proteínas del plasma.

En segundo lugar, se realiza un cultivo de queratinocitos en medio condicionado, obtenidos, también, a partir de una biopsia de piel. Una vez aislados se analizan dos situaciones. En la primera de ellas se induce la diferenciación de los queratinocitos, mediante la adición de calcio, con el objetivo de que se ensamblen y formen un epitelio estratificado que simule la epidermis natural. Por otro lado, se utilizan los queratinocitos aislados, sin confluir.

En ambos casos se estudian los exosomas, vesículas formadas por una bicapa lipídica que encierran RNA y proteínas, y que estas células secretan al medio, y se analiza su contenido proteico a través de la técnica Western Blot.

Por último, se cultiva una línea tumoral de carcinoma escamoso, y del mismo modo que en el caso anterior, se estudian los exosomas liberados por las células tumorales a través del análisis proteico con Western Blot y LC-MS/MS.

#### **5.3.2.1. Fluido intersticial**

La primera técnica consiste en la extracción de biopsias de tejido cutáneo de diferentes zonas del cuerpo, con el fin de analizar el contenido del IF obtenido de las células de la piel. Una vez excisionado, cada fragmento de tejido es incubado con PBS durante, aproximadamente 2 minutos, recolectando la solución de lavado y mezclándola con inhibidores de proteasas, para evitar así la degradación proteica. A continuación, las muestras son centrifugadas, y el sobrenadante resultante es decantado, liofilizado y disuelto en agua. Posteriormente, se lleva a cabo el análisis proteico (Burian et al., 2014).

#### **5.3.2.2. Cultivo de queratinocitos en medio condicionado**

En segundo lugar, se usa, sobre un cultivo de queratinocitos aislados de biopsias cutáneas, la técnica del cultivo en medio condicionado. Un medio condicionado es un tipo de medio de cultivo que contiene componentes, que afectan a las funciones celulares, y que han sido liberados al medio por células o tejidos previamente cultivados.



El procedimiento comienza con una circuncisión o biopsia del tejido cutáneo de un donante. Las muestras son recolectadas en un medio condicionado de queratinocitos libre de suero (KSFM) y lavadas con PBS estéril suplementado con una preparación de antibióticos y antifúngicos. Tras ello, la piel se fragmenta en pequeñas porciones sin tejido graso y se incuba con la enzima dispasa con el fin de separar dermis de epidermis.

La epidermis es incubada con tripsina a la vez que se vortea manualmente, posteriormente, para detener la reacción, se utiliza un suero fetal bovino. A continuación, se centrifuga la muestra con el fin de separar los queratinocitos sedimentados. Dichas células son sembradas y cultivadas con un medio libre de suero, con un suplemento de crecimiento y una preparación de antibióticos y antifúngicos. Para obtener la diferenciación de los queratinocitos y la formación de un epitelio se añade medio libre de suero con una determinada concentración de calcio. Al mismo tiempo, se mantiene un cultivo de queratinocitos indiferenciados, que es tratado de forma paralela. Ambos tipos son incubados con las soluciones correspondientes durante 24 horas.

Tras dicho periodo, el medio condicionado de queratinocitos (KCM) se clarifica a través de una centrifugación con el objetivo de eliminar los desechos, y se concentra utilizando un filtro especial. Tras ello, se añade óxido de sacarosa, se somete a una ultracentrifugación y el pellet resultante es recogido y diluido con PBS. Los exosomas purificados son entonces, lavados, concentrados por centrifugación y, posteriormente, analizados mediante Western Blot (Chavez-Muñoz, Kilani, & Ghahary, 2009).

#### 5.3.2.3. Cultivo de células de carcinoma escamoso

En tercer y último lugar, se opta por el cultivo de células tumorales con el fin de aislar y analizar los exosomas que de ellas derivan y estudiar su contenido proteico.

Las células de la línea tumoral de carcinoma escamoso A431 son cultivadas en DMED con una porción de FBS. Una parte del cultivo se siembra en placas con DMEM o RPMI con FBS, y se incuban a 37 grados centígrados con una atmosfera de CO<sub>2</sub>. Al alcanzar una determinada confluencia, el cultivo es adaptado a la privación de suero mediante la incubación con un medio mínimo esencial y FBS. A continuación, las células son lavadas, en una ocasión, con PBS, y tres veces, con medio libre de suero antes de incubarlas en un medio de este mismo tipo durante 48 horas.

Por último, el sobrenadante del cultivo es recogido y sometido a dos centrifugaciones sucesivas para eliminar células y desechos. El sobrenadante resultante es filtrado y sometido a una ultrafiltración. Los exosomas obtenidos en el pellet son lavados por resuspensión con PBS y analizados con Western Blot o LC-MS/MS (Park et al., 2010).

## **5.4. COMPARACIÓN PROTEICA**

El interés que supone poder identificar proteínas, únicas o características del tipo de neoplasia maligna analizada, el carcinoma escamoso, y el conocimiento que supondría hacerlo, ha permitido llevar a cabo una serie de estudios para esclarecer al máximo esta cuestión.

Todos los análisis realizados están enfocados a identificar el conjunto proteico del secretoma de diferentes tipos celulares. Como ya se ha comentado, el interés por todas las proteínas que secreta una célula o un tejido, ya sea de forma individual o en forma de vesículas, se ha incrementado exponencialmente en los últimos años. Esta nueva tendencia se debe a que el secretoma de una célula cancerígena es una posible fuente de nuevos biomarcadores tumorales, que puede sustituir al plasma y todas las complicaciones que este llevada asociadas.

En primer lugar, se tratarán de comparar las técnicas de obtención del secretoma, para, a continuación, pasar a estudiar las diferencias entre el SCC, una biopsia de piel sana y un cultivo en medio condicionado de queratinocitos; y acabar confirmando la validez de los resultados obtenidos.

### **5.4.1. Metodología de obtención**

El secretoma de una célula no es obtenido y analizado por un método concreto o estándar, sino que puede ser aislado mediante diferentes técnicas. Por esta razón, es interesante analizar si la metodología de obtención influye en el conjunto proteico resultante.

Para ello se compara el grado de coincidencia entre el conjunto de proteínas obtenido con el método de cultivar los queratinocitos en un medio condicionado (Chavez-Muñoz et al., 2009) y el que se obtenía si se realizaba una biopsia de piel y simplemente se analizaba qué proteínas estaban presentes en el fluido intersticial de la misma (Burian et al., 2014).

En el caso de los queratinocitos, destacar que se analizan, en primer lugar, aislados, es decir, sin que se les haya proporcionado las características necesarias para su confluencia y formación de un epitelio. Y en segundo lugar, una muestra de este mismo tipo celular pero estratificados y diferenciados, a modo de epidermis. De esta forma se podrá comprobar si la diferenciación supone una variación de la composición proteica de las mismas células, obtenidas a través del mismo método.

Las proteínas coincidentes entre el secretoma de un epitelio de queratinocitos en medio condicionado y el secretoma obtenido a partir de líquido intersticial de una biopsia de piel sana se muestran en la *tabla 1*.

*Tabla 1: Proteínas coincidentes en el secretoma de queratinocitos diferenciados a epitelio en cultivo en medio condicionado y en el fluido intersticial de la biopsia de piel.*

Protein name	Entry UniProt
Cathepsin L2	O60911
CD44 antigen	P16070
Cathepsin D	P07339
Ganglioside GM2 activator	P17900
Cathepsin B	P07858
Kallikrein-7	P49862
Kallikrein-5	Q9Y337

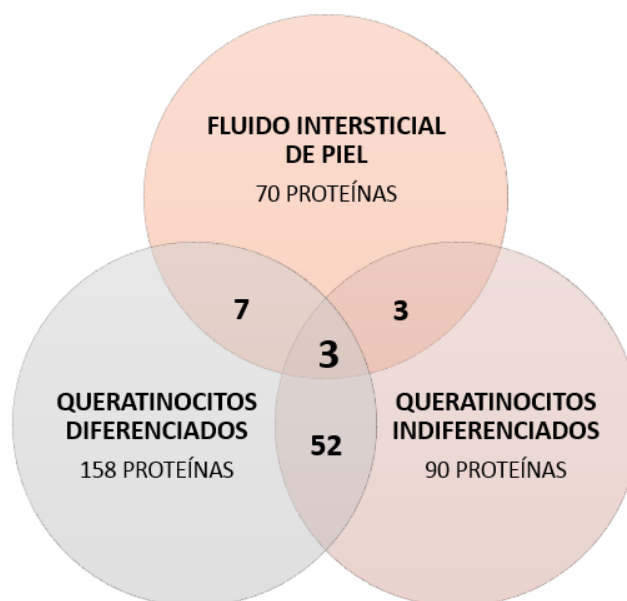
En este punto cabría recordar que, en todas y cada una de las comparaciones llevadas a cabo, se utilizó el código de entrada de cada proteína en la base de datos *UniProt*. Esta metodología resulta más fiable que utilizar el nombre o código que cada estudio ha utilizado para identificar a las proteínas con todas las variantes que esto supone.

De la misma forma que en el caso anterior, se comparó, el conjunto proteico del fluido intersticial de la biopsia de la piel sana y el cultivo en medio condicionado de queratinocitos indiferenciados, tal y como se muestra en la *tabla 2*.

*Tabla 2: Proteínas coincidentes en el secretoma de queratinocitos indiferenciados en cultivo en medio condicionado y en el fluido intersticial de la biopsia de piel.*

Protein name	Entry UniProt
Cathepsin D	P07339
Cathepsin B	P07858
Kallikrein-5	Q9Y337

Con el objetivo de tener una visión mucho más clara de esta comparación se realizó un diagrama de Venn, representado en la *figura 4* y en el que se recogen los tres grupos de proteínas analizados en este caso. En esta representación se muestra el número de proteínas totales identificadas en cada uno de los grupos estudiados, fluido intersticial de piel y queratinocitos diferenciados y sin diferenciar, y el conjunto proteico que presentan en común dichos grupos.



*Figura 4: Diagrama de Venn, proteínas coincidentes en el fluido intersticial de piel, y en el secretoma de queratinocitos, diferenciados e indiferenciados, a epitelio en cultivo en medio condicionado.*

Tal y como representa el diagrama anterior hay varios resultados que resulta interesante destacar. En primer lugar, se observan 52 proteínas secretadas en común por ambos tipos de queratinocitos. Esta cantidad supone un 32,9% del contenido proteico secretado por los queratinocitos diferenciados (158 proteínas), y un 57,8% en el caso de los indiferenciados (90 proteínas).

En segundo lugar, se detecta un 75% más de proteínas en el secretoma de este tipo celular en el caso de estar diferenciado. Mientras que los queratinocitos aislados secretan en los exosomas 90 proteínas, los confluentes y diferenciados a epitelio liberan al medio 158, doblándose casi esta cantidad.

Por último, destacar el bajo grado de coincidencia en el secretoma del fluido intersticial de piel sana y el de los exosomas secretados por los queratinocitos sanos. Tan solo son 7 las proteínas coincidentes entre los queratinocitos diferenciados y la biopsia de piel, reduciéndose esta cantidad a 3, en el caso de los indiferenciados. Estos valores tan solo oscilan entre el 3 y el 4% del contenido proteico secretado por este tipo celular.

#### **5.4.2. Queratinocitos sanos y carcinoma escamoso**

A continuación, se analizaron las diferencias entre el secretoma obtenido a través del cultivo condicionado de queratinocitos (Chavez-Muñoz et al., 2009) y el cultivo condicionado de una línea celular de SCC (Park et al., 2010). De este modo se quiso evidenciar, si utilizando la misma técnica, un cultivo celular en medio condicionado, las proteínas secretadas por las células sanas y por un tumor variaban.

Esta comparación proporcionará información sobre proteínas características del secretoma de este tipo tumoral, pudiendo analizar su función y concluyendo si son moléculas clave en la transformación tumoral o en la metástasis.

*Tabla 3: Proteínas coincidentes en el secretoma de queratinocitos diferenciados a epitelio en cultivo en medio condicionado y en el secretoma de un cultivo en medio condicionado de SCC.*

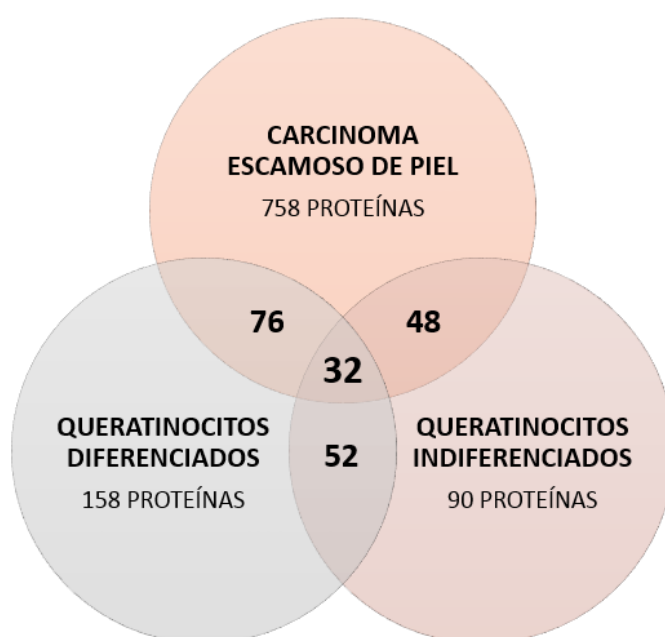
Protein name	Entry UniProt	Protein name	Entry UniProt
CD44E	P16070	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406
E-Cadherin	P12830	L-Lactate dehydrogenase A	P07195
Galectin 3	Q08380	Peroxiredoxin 2	P32119
Integrin alpha 6	P23229	Phosphogluconate dehydrogenase	P52209
Laminin alpha-5	O15230	Phosphoglycerate kinase 1	P00558
Laminin B1	P07942	Pyruvate kinase	P14618
Laminin B2	P11047	Fatty acid synthase	P49327
Transforming growth factor beta induced	Q15582	Transketolase	P29401
Secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor	P05067	Triosephosphate isomerase	P60174
Hsc70	P11142	Ubiquitin specific protease 14	P54578
T-complex protein 1	P50990	Valosin	P55072
Actin gamma	P63261	14-3-3 $\beta$	P31946
Actin related protein 3	P61158	14-3-3 $\eta$	Q04917
Actinin alpha 4	O43707	14-3-3 $\gamma$	P61981
Cofilin 1	P23528	14-3-3 $\sigma$	P31947
Ezrin (cytovillin 2)	P15311	14-3-3 $\tau$	P27348
F-actin	P52907	14-3-3 $\zeta$	P63104
Filamin A	P21333	Fibroblast growth factor binding protein 1	Q14512
Filamin B	O75369	Agrin precursor	O00468
Moesin	P26038	Cathepsin D	P07339
Plastin-3	P13797	CD109	Q6YHK3
Profilin 1	P07737	Clusterin	P10909
Talin 1	Q9Y490	Complement C3	P01024
Tubulin alpha 1	P68366	Epithelial cell growth factor 1	P00533
Tubulin alpha 8	Q9NY65	MHC Class 1	P01892
Eukaryotic translation elongation factor 1	P68104	Proteasome 26s	P62333
Eukaryotic translation elongation factor 2	P13639	Proteasome alpha 1	P25786
Keratin 14	P02533	Proteasome alpha 2	P25787
Keratin 2	P35908	Proteasome alpha 4	P25789
Keratin 5	P13647	Proteasome alpha 5	P28066
Keratin 6A	P02538	Proteasome alpha 7	O14818
Keratin 9	P35527	Proteasome beta 3	P49720
Annexin 1	P04083	Proteasome beta 4	P28070
Annexin A2	P07355	Proteasome subunit iota (macropain)	P60900
Alpha enolase	P06733	Ribosomal protein L12	P30050
L-Aminopeptidase	P55786	Ribosomal protein L18	Q07020
Carbonyl reductase 1	P16152	Tumor associated calcium signal transducer 2 precursor	P09758
Fructose biphosphate aldolase	P04075	Quiescin Q6	O00391

Tal y como en el caso anterior, se realizaron dos comparaciones, en primer lugar con los queratinocitos estratificado, tal y como aparece en la *tabla 3*. Y a continuación, con los queratinocitos aislados, sin diferenciar a epitelio, tal y como se representan en la *tabla 4*.

*Tabla 4: Proteínas coincidentes en el secretoma de queratinocitos indiferenciados en cultivo en medio condicionado y en el secretoma de un cultivo en medio condicionado de SCC.*

Protein name	Entry UniProt	Protein name	Entry UniProt
E-Cadherin	P12830	Aldehyde dehydrogenase	P00352
Galectin 3	Q08380	ATP synthase	P06576
Transforming growth factor beta induced	Q15582	Alpha enolase	P06733
Cyclophilin A	P62937	Aspartate transaminase	P17174
Cyclophilin B	P23284	Fructose biphosphate aldolase	P04075
Hsp27	P04792	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406
Hsp90 beta	P14625	L-Lactate dehydrogenase A	P07195
Actin gamma	P63261	Peroxiredoxin 4	Q13162
Cofilin 1	P23528	Phosphoglycerate kinase 1	P00558
Ezrin (cytovillin 2)	P15311	Pyruvate kinase	P14618
F-actin	P52907	Transketolase	P29401
Moesin	P26038	Triosephosphate isomerase	P60174
Tubulin alpha 1	P68366	Ubiquitin protein ligase	P22314
Eukaryotic translation elongation factor 1	P68104	Valosin	P55072
Eukaryotic translation elongation factor 2	P13639	14-3-3 $\beta$	P31946
Keratin 1 type II	P04264	14-3-3 $\eta$	Q04917
Keratin 14	P02533	14-3-3 $\gamma$	P61981
Keratin 5	P13647	14-3-3 $\zeta$	P63104
Keratin 10 type I	P13645	Cathepsin D	P07339
Keratin 13 type I	P13646	Complement C3	P01024
Keratin 16 type I	P08779	MHC Class 1	P01892
Annexin A2	P07355	Proteasome alpha 1	P25786
Rab 14	P61106	Proteasome alpha 5	P28066
Transforming protein Rho a residues (H12)	P61586	Ribosomal S16	P62249

De nuevo, se realizó un diagrama de Venn, *figura 5*, en el que se recogen las interrelaciones entre los tres conjuntos proteicos comparados.



*Figura 5: Diagrama de Venn, proteínas coincidentes en el secretoma de células de SCC, queratinocitos diferenciados y sin diferenciar, todos ellos en cultivo en medio condicionado.*

En este caso se puede observar que tanto si se trata de queratinocitos diferenciados o indiferenciados, hay una coincidencia aproximada del 50% con las proteínas presentes en el secretoma de los queratinocitos tumorales. De las 158 proteínas que secreta este tipo celular sano y diferenciado, 76 coinciden con el secretoma proteico de las tumorales. En el caso de los indiferenciados, 48 proteínas de las 90 que libera al medio, son secretadas también por los queratinocitos de la línea tumoral. También es interesante destacar, que de las 52 proteínas en común que presentan los exosomas del secretoma de los dos tipos de queratinocitos, tan solo 32, un 61%, están también presentes en la línea tumoral.

Sin embargo, en el secretoma de los queratinocitos tumorales se detecta un número mucho más elevado de proteínas, casi 760, frente a las 90 y 158 de los dos tipos de queratinocitos. Además, las pocas proteínas que tienen en común los queratinocitos sanos con el SCC sólo suponen entre un 5 a 10% de su contenido proteico.

Tras haber caracterizado las proteínas que eran exclusivas de esta línea tumoral, se utilizó *Gene Ontology Consortium* con la finalidad de analizar más en detalle este conjunto proteico. Utilizando la herramienta *PHANTER Pathways* se identificaron cuáles eran las principales vías de señalización en las que estaban implicadas estas proteínas, y si alguna de ellas estaba relacionada con la transformación tumoral o la metástasis. Los resultados obtenidos se muestran en la *figura 6*.

Displaying only results with False Discovery Rate < 0.05; [click here to display all results](#)

	Homo sapiens (REF)	upload_1				
PANTHER Pathways	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value
Unclassified	<a href="#">18605</a>	<a href="#">455</a>	565.88	.80	-	3.81E-31
<a href="#">Huntington disease</a>	<a href="#">135</a>	<a href="#">26</a>	4.11	6.33	+	1.69E-12
<a href="#">Parkinson disease</a>	<a href="#">98</a>	<a href="#">22</a>	2.98	7.38	+	6.47E-12
<a href="#">Cytoskeletal regulation by Rho GTPase</a>	<a href="#">80</a>	<a href="#">20</a>	2.43	8.22	+	1.11E-11
<a href="#">Ubiquitin proteasome pathway</a>	<a href="#">54</a>	<a href="#">15</a>	1.64	9.13	+	1.24E-09
<a href="#">Integrin signalling pathway</a>	<a href="#">162</a>	<a href="#">23</a>	4.93	4.67	+	6.46E-09
<a href="#">Dopamine receptor mediated signaling pathway</a>	<a href="#">50</a>	<a href="#">11</a>	1.52	7.23	+	1.49E-06
<a href="#">Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway</a>	<a href="#">227</a>	<a href="#">23</a>	6.90	3.33	+	1.61E-06
<a href="#">Cell cycle</a>	<a href="#">24</a>	<a href="#">8</a>	.73	10.96	+	3.10E-06
<a href="#">PI3 kinase pathway</a>	<a href="#">56</a>	<a href="#">11</a>	1.70	6.46	+	3.90E-06
<a href="#">Ras Pathway</a>	<a href="#">71</a>	<a href="#">12</a>	2.16	5.56	+	5.64E-06

*Figura 6: Principales vías de señalización en las que se encuentran implicadas las proteínas exclusivas de SCC.*

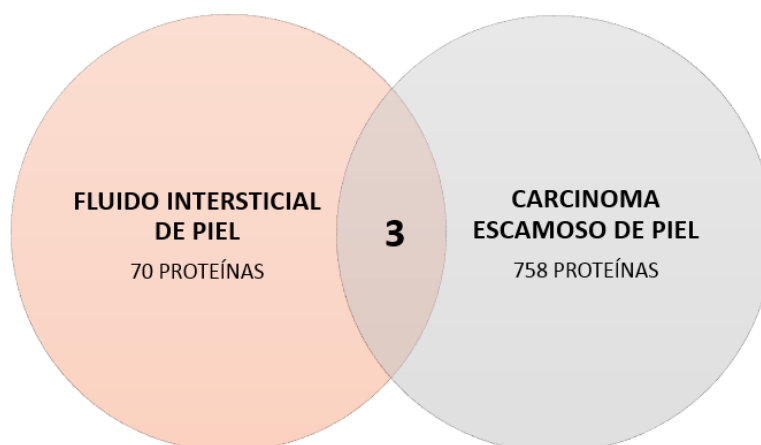
La figura muestra, ordenadas según el *P-value*, las principales vías de señalización en las que, probablemente, se encuentren implicadas las proteínas exclusivas del SCC. En función de estos datos, se pueden destacar varias vías de señalización de gran relevancia en cualquier proceso tumoral: la vía Ras con un enriquecimiento de 5,56, la vía de la quinasa PI3 con un enriquecimiento de 6,46, la vía de señalización de las integrinas con un enriquecimiento de 4,67 o la vía de control del ciclo celular con un enriquecimiento de 10,96.

#### 5.4.3. Otras comparaciones

Para comprobar que cultivar queratinocitos e inducir su diferenciación en forma de epitelio, a través de técnicas como la adición de calcio, no afecta a su secretoma generando una secreción diferente a la de la piel *in vitro*, se realizó una tercera y última comparación. Pese a ser técnicas diferentes se analizó el secretoma obtenido a través del líquido intersticial de la biopsia de piel (Burian et al., 2014) y el secretoma del medio condicionado de SCC (Park et al., 2010). De esta forma se podrán analizar las diferencias en una línea celular tumoral cultivada y una biopsia de piel totalmente sana. Los resultados se muestran recogidos en la *tabla 5* y en forma de diagrama de Venn en la *figura 7*.

*Tabla 5: Proteínas coincidentes en el líquido intersticial de una biopsia de piel y en el secretoma de un cultivo en medio condicionado de SCC.*

Protein name	Entry UniProt
CD44 antigen	P16070
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	Q9HB40
Cathepsin D	P07339



*Figura 7: Diagrama de Venn, proteínas coincidentes en el fluido intersticial de piel y en el secretoma de un cultivo en medio condicionado de una línea de SCC.*



Como queda reflejado en la figura anterior, las 3 proteínas coincidentes entre ambos conjuntos, representan menos del 0,5 % en el caso de la línea tumoral, y tan solo un 4,3% en el caso del órgano cutáneo integro. De nuevo, es interesante destacar la gran diferencia numérica entre el contenido proteico del secretoma de los queratinocitos de SCC y del fluido intersticial de piel.

A continuación, para tratar de esclarecer aún más las coincidencias y las diferencias entre los tres tipos celulares analizados, queratinocitos sanos, queratinocitos tumorales y piel sana, se realizó una comparación entre todos ellos, utilizando, de nuevo, los queratinocitos diferenciados e indiferenciados de manera independiente. Los resultados aparecen representados en la *figura 8*.



*Figura 8: Diagrama de Venn, proteínas coincidentes en el fluido intersticial de piel y en el secretoma de un cultivo en medio condicionado de una línea de SCC.*

Tal y como muestra el diagrama de Venn, *figura 8*, y la *tabla 6*, la única proteína secretada y coincidente es la Cathepsina D. Sin necesidad de proporcionar porcentajes queda constatada la casi nula coincidencia entre los 3 tipos celulares.

*Tabla 6: Proteínas coincidentes en el líquido intersticial de una biopsia de piel, el secretoma de un cultivo en medio condicionado de SCC y el secretoma de un cultivo en medio condicionado de queratinocitos diferenciados e indiferenciados, respectivamente.*

Protein Name	Entry UniProt
Cathepsin D	P07339

Debido a las pocas coincidencias resultantes en los dos últimas comparaciones, se decidió, con la finalidad de confirmar la fiabilidad de todos los análisis hasta el momento realizados, utilizar todo el proteoma secretado por el órgano cutáneo.

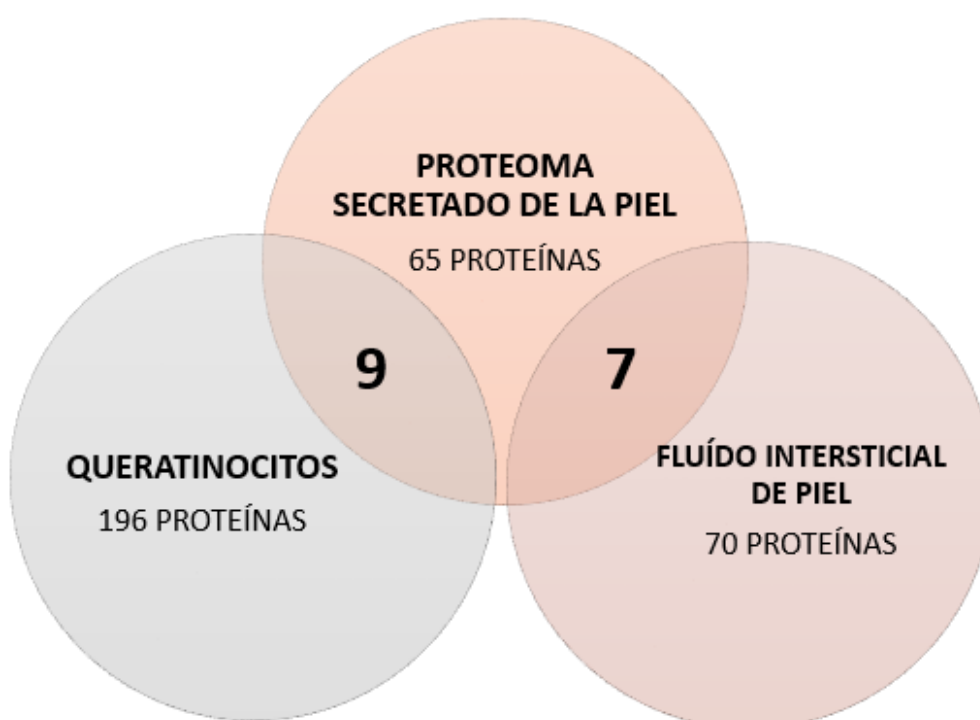
*Tabla 7: Proteoma secretado por las células cutáneas normales.*

Protein name	Protein name
Matrix metalloproteinase 27	Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
Urocortin 2	Prominin 2
WAP four-disulfide core domain 12	Interleukin 34
Cystatin E/M	Dermokine
Defensin, beta 103A	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 6
Defensin, beta 103B	Multiple EGF-like-domains 6
Prosaposin-like 1 (gene/pseudogene)	Serpin peptidase inhibitor, clase A, member 12
IGF-like family member 3	Kallikrein-related peptidase 5
Lipase, family member N	Deoxyribonuclease I-like 2
Lipase, family member K	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2
Psoriasis susceptibility 1 candidate 2	Lipase, family member M
Corneodesmosin	Potassium channel, subfamily K, member 7
Chromosome 6 open reading frame 15	WAP four-disulfide core domain 5
Glypican 2	Neurexophilin 4
Chemokine (C-C motif) ligand 27	Iron/zinc purple acid phosphatase-like protein
Wingless-type MMTV integration site family, member 3	BPI fold containing family C
Wingless-type MMTV integration site family, member 16	Premelanosome protein
Interleukin 20 receptor, alpha	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	Zinc activated ligand-gated ion channel
Fibroblast growth factor receptor 3	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
Fibroblast growth factor 22	Keratinocyte differentiation-associated protein
Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
Laminin, beta 4	Arylacetamide deacetylase-like 2
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	Chromosome 6 open reading frame 25
EPH receptor B6	IGF-like family member 2
Collagen, type VII, alpha 1	C1q and tumor necrosis factor related protein 9B
Interleukin 1 receptor-like 2	Neurotrophin 4
Carboxypeptidase A4	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2
Kallikrein-related peptidase 14	Stereocilin
Kringle containing transmembrane protein 2	Coiled-coil glutamate-rich protein 2
Periostin, osteoblast specific factor	Uncharacterized protein
Low density lipoprotein receptor-related protein 4	Homo sapiens kallikrein-related peptidase 9 (KLK9), mRNA.
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	

El resultado es un análisis de la expresión proteica y del RNA específico de todos los tejidos humanos, que cubre más del 90% de los genes putativos codificantes para proteínas (Uhlén et al., 2015). Este listado proteico, que viene recogido en la *tabla 6*, se utilizó para comprobar que las proteínas obtenidas en los casos anteriores venían incluidas en él.

Una vez caracterizadas todas las proteínas que se esperaba obtener en los análisis realizados, se llevó a cabo una comparación entre este proteoma, el fluido intersticial de piel sana y los exosomas de los queratinocitos cultivados en medio condicionado.

Aunque las técnicas de obtención fueron totalmente diferentes, se esperaba que la mayoría de proteínas obtenidas con la biopsia de piel estuvieran representadas en este listado, y que ocurriera lo mismo con los queratinocitos, independientemente de su estado de diferenciación. Los resultados obtenidos se muestran en forma de diagrama de Venn en la *figura 9*.



*Figura 9: Diagrama de Venn, proteínas coincidentes entre el fluido intersticial de piel y el proteoma de piel. Y proteínas coincidentes entre el secretoma de un cultivo en medio condicionado de queratinocitos y el mismo proteoma de piel.*

Como queda representado, de las 196 proteínas que secretan en forma de exosomas los queratinocitos sanos, en este caso, sin distinguir los diferenciados de los indiferenciados, tan solo 9 están recogidas en el proteoma secretado por la piel. Ocurre algo similar con el fluido intersticial de una biopsia de piel sana, ya que solo 7 de las 70 proteínas están representadas en este listado proteico.

También es interesante comprobar que el proteoma contiene un número ligeramente inferior de proteínas que el órgano cutáneo, 65 frente a 70, pero que las diferencias se incrementan si se compara con los queratinocitos, 196 proteínas frente a 65.

## **6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **6.1. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN**

En primer lugar, resulta interesante comprobar que el grado de diferenciación de los queratinocitos puede tener un impacto muy significativo en la composición del secretoma, se detecta un 75% más de proteínas en el secretoma de células diferenciadas, con una coincidencia aproximada de, tan solo, el 30%.

La simple adición de calcio, no solo ha supuesto la diferenciación de los queratinocitos cultivados a un epitelio, si no la secreción de una serie de proteínas totalmente diferentes a las excretadas por el mismo tipo celular pero de forma aislada o individual. Se puede asumir que este conjunto proteico, tan solo son 52 las proteínas secretadas en común por ambos tipos de queratinocitos, no está, por tanto, implicado en la diferenciación celular y es característico de un queratinocito como tal.

Debido a la poca coincidencia proteica entre los exosomas secretados por ambos tipos de queratinocitos hubiera resultado interesante analizar si estos resultados siguen la misma tendencia en otros trabajos. Pese al interés, ha resultado ser imposible encontrar un estudio que sirviera de referencia para validar estos hallazgos por la novedad que supone el tema tratado y analizado en esta revisión bibliográfica.

Comparando ahora el método de obtención del secretoma, cultivo en medio condicionado u obtención del fluido intersticial, es resaltable que pese a esperar diferencias en los resultados, el contenido proteico no debería haber variado en gran medida. Pese a ser técnicas totalmente diferentes, en el caso de los queratinocitos diferenciados, tanto la piel como estos últimos, son componentes sanos que, además, poseen una diferenciación epitelial. Pese a todas estas suposiciones las diferencias son mucho mayores de lo esperado.

El porcentaje de proteínas coincidentes entre el fluido intersticial de piel y los exosomas de los queratinocitos sanos oscila entre un 3 y un 10% en función de la lista de referencia. Ciertamente, los mejores porcentajes corresponden a la comparación entre fluido intersticial de piel y queratinocitos diferenciados, tal y como era de esperar. En cualquier caso, el bajo nivel de coincidencia se puede explicar por distintas razones.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que los queratinocitos en cultivo representan el componente principal de solo una de las 3 capas de la piel, la epidermis, y principalmente, de tan solo uno de sus estratos, la capa basal proliferativa. Por tanto, las muestras de piel estarán enriquecidas con proteínas de la dermis y capas

suprabasales de la epidermis que no estarán presentes en los cultivos de queratinocitos. Además, hay que añadir que en el caso de la biopsia de piel se está analizando el contenido proteico del fluido intersticial. Este último abarca tanto el contenido proteico del secretoma como el drenaje plasmático de los vasos sanguíneos y la linfa.

Un segundo aspecto más metodológico es la importancia que puede llegar a adquirir, en la técnica de obtención, el tiempo de incubación del componente en concreto. Mientras que un periodo demasiado largo puede suponer la muerte celular, un tiempo corto puede resultar ser insuficiente para la extracción, ya sea del IF como de los exosomas. Este aspecto puede explicar que en el fluido intersticial de un fragmento de piel, totalmente integro, se obtengan menos proteínas (70) que las secretadas por un cultivo de queratinocitos, tanto diferenciados (158) como sin diferenciar (90). Mientras que en el caso de la piel, el lavado realizado era de tan solo 2 minutos, en el caso de los queratinocitos el periodo de incubación era de 24 horas.

En todos y en cada uno de los casos analizados, hasta el momento, y en los que se analizan a continuación, puede ser resaltado otro aspecto: el lavado de los materiales incubados. Si esta etapa previa a la incubación no se efectúa de manera adecuada puede que en los resultados se obtengan proteínas tales como el fibrinógeno procedente de coágulos sanguíneos mal eliminados.

Globalmente, se hace evidente que la metodología de obtención que se utiliza, en este caso, para obtener el secretoma de un conjunto de células o de un tejido, puede afectar en gran medida a los resultados obtenidos.

## **6.2. QUERATINOCITOS SANOS Y CARCINOMA ESCAMOSO**

En este trabajo también se ha analizado el secretoma obtenido, utilizando la misma técnica, un cultivo condicionado, de una línea tumoral de SCC y de los dos tipos de queratinocitos, diferenciados y sin diferenciar. Este análisis puede aportar mayor información sobre este tipo de neoplasia maligna.

Aunque los resultados numéricos muestran que los queratinocitos diferenciados tienen más proteínas de los exosomas, en común con el SCC, que los indiferenciados, los porcentajes, 48,1 % y 53,3% respectivamente, demuestran lo contrario. Tal y como se esperaba obtener, un queratinocito indiferenciado, que no forma un epitelio, comparte más proteínas secretadas con este tipo de célula cancerígena. Las células tumorales poseen la característica de la “indiferenciación” y es precisamente ese factor el que hace más similares las células del SCC a su célula originaria sin diferenciar, un queratinocito.

Aunque los resultados sí muestran la tendencia más lógica, no representan con exactitud lo esperado. Debido a que el conjunto proteico que comparten los dos tipos de queratinocitos es, tan solo del 30%, se esperaría que este tipo celular indiferenciado tuviera en común muchas más proteínas con el SCC, en relación a los diferenciados.

Peso a ello, cabe destacar también, el inmenso número de proteínas obtenidas en la línea tumoral de SCC, 758, en relación a las 158 y las 90 de los queratinocitos. Aunque queda evidenciado que la transformación tumoral puede suponer un paso atrás en la diferenciación celular suponiendo la expresión de un conjunto mucho mayor de proteínas, hay que tener en cuenta otro factor. El contenido proteico de la línea tumoral utilizada en el análisis puede variar en función del grado de diferenciación y la agresividad del tumor de procedencia. Por este motivo habría que caracterizar con más profundidad el origen de esta línea ya que es un factor que puede afectar al resultado.

Además, también puede influir el tiempo de incubación ya comentado en el caso anterior. Mientras que los queratinocitos eran incubados tan solo 24 horas, las células del SCC permanecían 48 horas. Esta diferencia temporal puede haber supuesto la recogida de una mayor cantidad y diferentes tipos de exosomas, que a su vez haya permitido caracterizar más proteínas. O en el caso contrario, que las 48 horas de incubación hayan supuesto la muerte celular y en el resultado proteico analizado se incluyan todas las proteínas celulares.

De estas 758 proteínas secretadas, supuestamente en exosomas, solo un 4,2% está presente tanto en queratinocitos diferenciados como en indiferenciados. Todo el listado de proteínas que no presentan en común es susceptible, por tanto, de ser característico de este tipo de cáncer, de la transformación tumoral y de incluso la metástasis.

Para comprobar la posible implicación de este listado proteico en el metabolismo tumoral se hizo uso de una de las herramientas de GO. Esto permitió caracterizar en qué vías principales de señalización participaba todo el conjunto proteico exclusivo del secretoma de SCC. Los resultados mostraron un enriquecimiento en rutas implicadas en cualquier proceso tumoral, la vía Ras, la vía de las integrinas, o la vía de la quinasa PI3.

La desregulación de la vía de señalización de las integrinas, es responsable, precisamente, del crecimiento descontrolado e independiente y de la fijación de una célula tumoral. El enriquecimiento de este tipo proteico explicaría por qué la alteración de estos complejos proteicos supone la regulación proliferativa de las células tumorales, o el proceso de la angiogénesis (Zúñiga et al., 2014).

Por otro lado, el aumento relativo de las proteínas de la vía de señalización Ras también es característico de cualquier célula neoplásica. La activación inapropiada del gen Ras ha demostrado ser una importante vía de la señal de transducción celular para la proliferación y transformación maligna de los tumores (Crespo, 2009).

Además, la ruta de señalización de la quinasa PI3 juega un papel fundamental en el metabolismo del cáncer contribuyendo a la progresión del ciclo celular, disminuyendo la apoptosis e incrementando las capacidades metastásicas de las células cancerígenas. La activación descontrolada de la ruta de PI3K contribuye, por tanto, a la transformación celular y a la progresión tumoral (BioCancer Research journal, 2016).

Y por último, el enriquecimiento del secretoma de células de SCC en proteínas del ciclo celular. La alteración y desregulación de las proteínas encargadas del control del ciclo celular es, precisamente, el motivo principal del desarrollo de un tumor (Quezada, 2007).

Se puede concluir, por tanto, que la gran parte de las proteínas características y exclusivas del secretoma de SCC en relación a su tipo celular de origen, los queratinocitos, encontradas en esta revisión bibliografía están implicadas en procesos tumorales y metastásicos. Por este motivo, es un listado proteico digno de ser analizado en búsqueda de nuevos biomarcadores de esta enfermedad.

### **6.3. OTRAS COMPARACIONES**

Si ahora se analizan los resultados obtenidos de la comparación de las proteínas en el fluido intersticial de piel y el medio condicionado de SCC, se vuelve a corroborar la gran influencia de la metodología, pero también, lo poco en común que presenta a nivel proteico un epitelio sano con una célula tumoral, ya que tan solo son 3, las proteínas secretadas que presentan en común.

En el caso de hacer una comparación cuádruple entre los queratinocitos diferenciados y sin diferenciar, los queratinocitos de la línea tumoral de SCC y el fluido intersticial de piel, se puede observar que la única coincidencia entre los 4 conjuntos es 1 proteína. Esto vuelve a demostrar la influencia de la metodología de obtención, la transformación tumoral, e incluso la diferenciación de los queratinocitos a epitelio.

Por último, y con la finalidad de validar todos los resultados, debido a lo inesperados que resultan, es interesante ver si todas las proteínas obtenidas en ambos métodos de análisis, queratinocitos y piel sanos, se encuentran reflejadas en el proteoma cutáneo secretado.

Los resultados son realmente sorprendentes ya que solo el 4,6 % de proteínas de los queratinocitos totales (con y sin diferenciar) estaban presentes en el proteoma. Y solo el 10% de las proteínas del fluido intersticial aparecían en dicho listado.

Las conclusiones que se puede obtener respecto a este último punto son diversas y muy variadas. En primer lugar, se hubiera esperado encontrar la mayoría de las proteínas de la piel en el proteoma, ya que lo que se incuba y analiza es un fragmento de piel totalmente integro. Y destacar, la mayoría, puesto que se analiza el fluido intersticial, el cual no solo incluye el secretoma de la piel como ya se ha comentado. Por lo que, probablemente, todas las proteínas que de él proceden no sean recogidas como proteoma que secreta el órgano cutáneo.

En el caso de los queratinocitos las grandes diferencias podrían ser algo más entendibles respecto al número de coincidencias en el proteoma. Los queratinocitos suponen solo uno de los tipos celulares, aunque sí el más común, de la epidermis, una de las 3 capas de la piel. Por este motivo sería entendible que muchas de las proteínas del proteoma cutáneo no se reflejaran en los exosomas secretados por los queratinocitos.

Sin embargo, de nuevo, la mayoría de las proteínas secretadas por un queratinocito debería encontrarse en el listado del proteoma, especialmente esas 52 proteínas que, como anteriormente se ha comprobado, son características de este tipo celular como tal y no de su estado de diferenciación. Puede que en este caso, el tratarse de un cultivo único y exclusivo de queratinocitos, sin las interacciones con el resto de tipos celulares de la epidermis, haya influenciado el resultado obtenido.



## BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. (2017). Skin Cancer: Melanoma, Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma. Retrieved October 10, 2017, from <https://www.webmd.com/melanoma-skin-cancer/melanoma-guide/skin-cancer#1>
- BioCancer Research journal. (2016). La Ruta De Señalización Pi3k/akt/mtor. Retrieved January 13, 2018, from <http://www.biocancer.com/journal/1178/3-la-ruta-de-senalizacion-pi3kaktmtor>
- Burian, M., Velic, A., Matic, K., Günther, S., Kraft, B., Gonser, L., ... Schitteck, B. (2014). Quantitative Proteomics of the Human Skin Secretome Reveal a Reduction in Immune Defense Mediators in Ectodermal Dysplasia Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3), 759–767. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.462>
- Cancer, A. S. (2017). ¿Cuáles son las estadísticas principales del cáncer de piel tipo melanoma? Retrieved November 15, 2017, from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/acerca/estadisticas-clave.html>
- Carvalho, L. P., Miot, H. A., Esther, M., & Marques, A. (2017). Initial basal cell carcinomas diagnosed in the National Campaign for Skin medical referral system \* s. *Sociedade Brasileira de Dermatologia*, 92, 26–29.
- Chavez-Muñoz, C., Kilani, R. T., & Ghahary, A. (2009). Profile of exosomes related proteins released by differentiated and undifferentiated human keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), 221–231. <https://doi.org/10.1002/jcp.21847>
- Crespo, P. (2009). La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. *Redes de Señalización Y Estrategias Terapéuticas*, 123–137. Retrieved from <http://media.analesranf.com/index.php/mono/article/viewArticle/812>
- Fuchs, E. (2008). Skin stem cells: Rising to the surface. *Journal of Cell Biology*, 180(2), 273–284. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708185>
- Kang, T.-H., Yoon, G., Kang, I.-A., Oh, H.-N., Chae, J.-I., & Shim, J.-H. (2017). Natural Compound Licochalcone B Induced Extrinsic and Intrinsic Apoptosis in Human Skin Melanoma (A375) and Squamous Cell Carcinoma (A431) Cells. *Phytotherapy Research : PTR*, (August). <https://doi.org/10.1002/ptr.5928>

- Lawlor, K., Nazarian, A., Lacomis, L., Tempst, P., & Villanueva, J. (2009). Pathway-based biomarker search by high-throughput proteomics profiling of secretomes. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1489–1503.  
<https://doi.org/10.1021/pr8008572>
- Makridakis, M., & Vlahou, A. (2010). Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of Proteomics*, 73(12), 2291–2305.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.001>
- Martorell-Calatayud, A., Sanmartín Jimenez, O., Cruz Mojarrieta, J., & Guillén Barona, C. (2013). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Defining the High-Risk Variant. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 104(5), 367–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.adengl.2011.12.012>
- Méndez, O., & Villanueva, J. (2015). Challenges and opportunities for cell line secretomes in cancer proteomics. *Proteomics - Clinical Applications*, 9(3–4), 348–357. <https://doi.org/10.1002/prca.201400131>
- Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., & Di, D. (2015). Extracellular Vesicles in Cancer : Exosomes , Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>
- Nu, A., Pinedo-moraleda, F., & López-estebanz, J. L. (2012). High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma &, 103(7), 567–578.  
<https://doi.org/10.1016/j.adengl.2012.08.004>
- OMS | Cáncer. (2017). *WHO*.
- Park, J. E., Tan, H. Sen, Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., ... Sze, S. K. (2010). Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6), 1085–1099.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M900381-MCP200>
- Quezada, M. A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS*, 65, 5–12.
- Rees, J. R., Zens, M. S., Celaya, M. O., Riddle, B. L., Karagas, M. R., & Peacock, J. L. (2015). Survival after squamous cell and basal cell carcinoma of the skin: A retrospective cohort analysis. *International Journal of Cancer*, 137(4), 878–884.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.29436>

- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome.  
<https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Wu, S., Cho, E., Feskanich, D., Li, W.-Q., Sun, Q., Han, J., & Qureshi, A. A. (2015). Citrus consumption and risk of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Carcinogenesis*, 36(10), 1162–1168.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgv109>
- Xiang, T., Bai, J., She, C., Yu, D., Zhou, X., & Zhao, T. (2017). Bromodomain protein BRD4 promotes cell proliferation in skin squamous cell carcinoma. *Cellular Signalling*, 42(October 2017), 106–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.010>
- Zúñiga Cerón L.F., Freyre Bernal S. I., Navia Amézquita C. A., S. T. J. S. (2014). Adhesión celular : el ensamblaje de la vía al cáncer. *Morfología*, 6(2), 3–19.